

بررسی پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 در بیماران مبتلا به کراتوکونوس در چهارمحال و بختیاری

راضیه کرمی اشکفتکی^۱، عفت فرخی^۲، نوشا ضیا^۱، مرتضی هاشم زاده چالشتی^{۳*}

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران. ^۲مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: کراتوکونوس، یک اختلال دژنراتیو در چشم است که منجر به نامنظم شدن سطح قرنیه، نازک شدن آن، تغییر شکل مخروطی تر و خارج شدن از شکل طبیعی خود و کاهش بینایی می شود. بروز آن بین ۱ در ۵۰۰ نفر تا ۱ در ۲۰۰۰ نفر در سراسر جهان برآورد شده است. ژن های مختلفی در ارتباط با این بیماری بررسی شده اند؛ اما شواهدی مبنی بر نقش بیشتر ژن (VSX1= Visual system homeobox1) در اتیولوژی کراتوکونوس وجود دارد. در این مطالعه پلی مورفیسم rs6050307 در آگزون شماره یک ژن VSX1 در ۱۰۰ بیمار مبتلا به کراتوکونوس در استان چهارمحال و بختیاری بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 در ۱۰۰ فرد مبتلا به کراتوکونوس و ۱۰۰ فرد سالم از نظر بیماری کراتوکونوس بررسی شد. DNA با روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شد و پلی مورفیسم ژن VSX1 با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز- پلی مورفیسم طولی قطعات محدود (PCR-RFLP) بررسی گردید؛ سپس فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم rs6050307 در ۲ گروه بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری کای اسکور تجزیه و تحلیل گردید و ارتباط فراوانی ژنوتیپی و آللی در پلی مورفیسم با بیماری بررسی شد.

یافته ها: در این مطالعه بین توزیع ژنوتیپ ها و آلل های مختلف پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 با بیماری کراتوکونوس ارتباطی به دست نیامد ($P>0/05$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می رسد که پلی مورفیسم rs6050307 از ژن VSX1، به عنوان یک ریسک فاکتور در بیماری زایی کراتوکونوس نقش نداشته باشد.

واژه های کلیدی: کراتوکونوس، ژن VSX1، PCR-RFLP.

مقدمه:

موارد پیشرفته، ادم قرنیه رخ داده و عدم جبران آن، سبب ایجاد اسکار در قرنیه شده و می تواند به نابینایی منجر گردد. علائم، بسته به مرحله بیماری متفاوت هستند و در مراحل حاد، بیمار کاندید پیوند قرنیه می گردد (۴). کراتوکونوس از مهم ترین عوامل پیوند قرنیه در کشورهای غربی است (۵، ۶). این بیماری معمولاً در دهه ی دوم زندگی و در دوران بلوغ رخ می دهد (۲، ۷)؛

کراتوکونوس اختلالی است که در آن قرنیه برآمده شده و از شکل طبیعی خود خارج می شود (۱). در واقع این بیماری دیستروفی ۲ طرفه و پیشرونده قرنیه می باشد که منجر به نازک شدن و مخروطی شدن شکل شدن قرنیه می گردد (۲، ۳). این تغییر شکل قرنیه سبب میوپی یا نزدیک بینی و آستیگماتیسم که یک عیب انکساری است، شده که دید فرد را تحت تأثیر قرار می دهد. در

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی- تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۳۱۴۷۱

E-mail: mchalesh@yahoo.com

همچنین بروز بیماری در سنین پایین تر و نوجوانی نیز گزارش شده است و این روند پیشرونده تا دهه چهارم زندگی ادامه خواهد داشت (۸). بروز آن بین ۱ در ۵۰۰ نفر تا ۱ در ۲۰۰۰ نفر در سراسر جهان برآورد شده است و شایع ترین علت پیوند قریه در آمریکاست (۷).

شیوع کراتوکونوس از ۸/۸ تا ۵۴/۴ در ۱۰۰ هزار نفر رخ می دهد و شیوع بیماری ۱/۵۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ در کل دنیا می باشد، این دامنه تغییر به علت تفاوت در معیارها و تجهیزات تشخیصی می باشد و در هر ۲ جنس و کلیه نژادها مشاهده می گردد (۹-۱۲). البته شیوع کراتوکونوس در خویشاوندان درجه یک بیماران آن، ۳/۳۴٪، بیشتر از جمعیت نرمال می باشد (۷). انتقال فامیلی در ۶٪ تا ۲۳/۵٪ موارد گزارش شده است و انطباق آن در دوقلوهای مونوزیگوت بیشتر می باشد (۷، ۱۳، ۱۴). در مطالعه ای در انگلستان، شیوع بیماری در آسیایی ها ۷/۵ برابر قفقازی ها گزارش گردید و علت آن را مرتبط با ازدواج های فامیلی، مخصوصاً ازدواج درجه ی یک خویشاوندی، دانستند (۱۵). کراتوکونوس، با بیماری های سندرم داون، اختلال بینایی مادرزادی لبر (Leber)، پرولاپس دریچه میترا، آسم، نوروفیروماتوز، درماتیت، گزودرما پیگمنتوزا، رتینیت پیگمنتوزا و سندرم مارفان ارتباط دارد (۱۷، ۱۶، ۷).

علی رغم مطالعات گسترده، پروسه های پاتوفیزیولوژی و اتیولوژی ژنتیک کراتوکونوس ناشناخته می باشد. در مطالعه ای کراتوکونوس به صورت وراثت اتوزومی مغلوب مشاهده شد و در مطالعه ی دیگر الگوی اتوزومی غالب کراتوکونوس گزارش گردید (۱۸، ۱). چندین مورد از ابتلا در چند نسل (۳ نسل) گزارش شد (۱۹)؛ همچنین وراثت چند عاملی (Multifactorial) آن نیز مشاهده شده است (۲۰). شواهدی مبنی بر نقش ژن $VSX1$ (Visual system homeobox1) (واقع بر MIM 605020.20p11.2) در اتیولوژی کراتوکونوس وجود دارد (۲۱). ژن های مختلفی در ارتباط با این بیماری بررسی شده اند که در هر کدام، جهش ها و پلی مورفیسم های متعددی در ارتباط با این بیماری کشف

شده است. در رابطه با این بیماری بیشترین جهش ها در ژن VSX1 مشاهده شده است.

ژن VSX1 حاوی ۷ اگزون (۵ اگزون در ناحیه رمزگذار و ۲ اگزون در ناحیه غیر رمزگذار) می باشد. این ژن پروتئینی را رمز می کند که حاوی یک توالی تنظیمی هوموئومین می باشد که به ناحیه کنترل ژن های خوشه ای رنگدانه سبز و قرمز بینایی متصل می شود و بیان ژن های اسپین مخروطی را در اوایل تکامل کنترل می کند و جهش در این ژن می تواند منجر به دیستروپی قریه و قوز قریه یا کراتوکونوس شود (۲۲، ۲۳).

با توجه به این که هنوز نقش دقیق تغییرات ژن VSX1 در ایجاد بیماری کراتوکونوس مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 و ارتباط آن با بیماری کراتوکونوس در جمعیت ایرانی به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز- پلی مورفیسم طولی قطعات محدود (PCR-RFLP) در استان چهارمحال و بختیاری طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی نمونه های خون، پس از کسب رضایت نامه از بیماران و یا والدین آن ها و تکمیل پرسش نامه مربوط به اطلاعات بالینی و دموگرافیک از ۱۰۰ بیمار مبتلا به کراتوکونوس و ۱۰۰ فرد سالم که توسط پزشک متخصص از کلینیک چشم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد پذیرش و معاینه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت (۲۴، ۲۵). از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله های حاوی EDTA نیم مولار (Merck-آلمان) دریافت شد و نمونه های خون تا زمان شروع استخراج DNA در ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد فنل کلروفرم و طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد (۲۶). غلظت DNA با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Thermo-آمریکا) به دست

آمد. جهت تعیین غلظت و تأیید عدم آلودگی DNA، نسبت جذب نوری DNA در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ توسط نانو دراپ به دست آمد.

واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۱۹۱ جفت بازی از ناحیه کد کننده ژن VSX1 انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. هر میکروتیوب شامل ۰/۴ میکرولیتر از هریک از پرایمرها (۱۰ PM)، ۱ میکرولیتر دی کلرید منیزیم (۱۰۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر DNA (۲۰۰ ng)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱X)، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Taq پلی مرز (۵ unit/μl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM) (KBC- ایران) بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسیده بود.

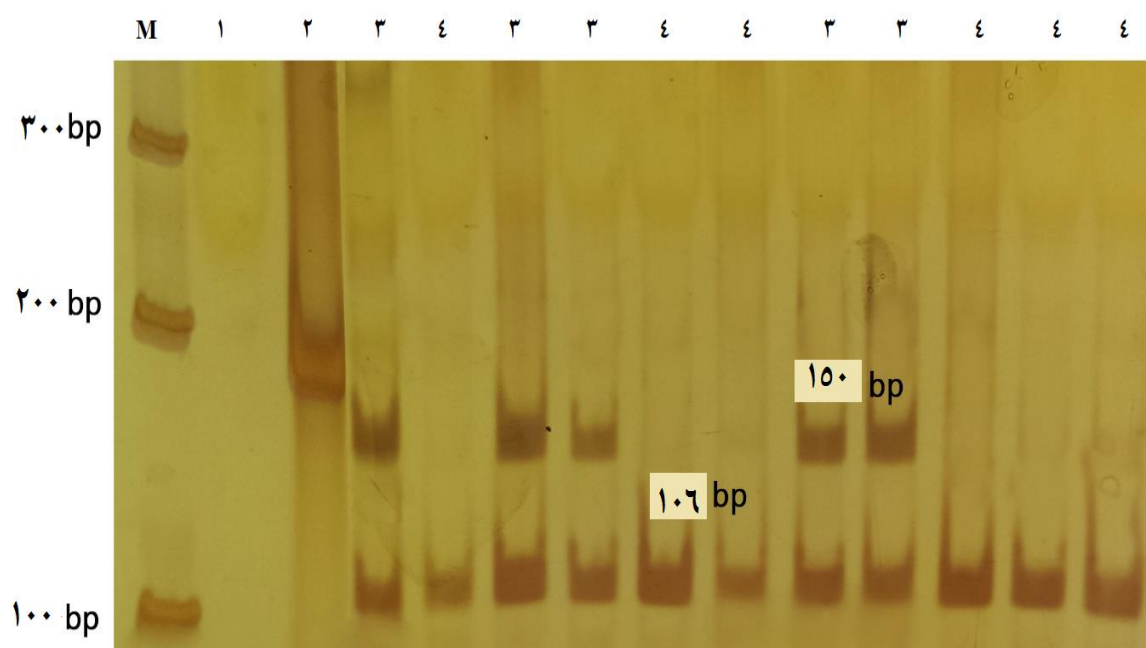
شرایط انجام آزمایش عبارت است از: مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشت به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۵°C درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها به DNA هدف به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C درجه سانتی گراد جهت گسترش رشته های مکمل به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام گسترش نهایی در ۷۲ °C درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن VSX1 (refGene_NM_008101.1) که با نرم افزار 3 Primer طراحی شدند شامل F:5'CTGATTACCGGACGTGGAGA3' و R:5'GACTCGGCCTCCTCTGTG3' بود. این پرایمرها توالی ۱۹۱ جفت بازی را تکثیر می کنند. پس از انجام PCR محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با نیترا نقره رنگ آمیزی گردید. جهت انجام PCR-RFLP از آنزیم محدود الاثر BSh1285I (Fermentas- کانادا) استفاده شد. این آنزیم جایگاه ۵'-CGRYCG-۳' را شناسایی می کند.

بدین منظور، مقدار ۴ μl از محصول PCR را در میکروتیوب ریخته و در مجاورت آنزیم محدود الاثر و بافر مربوطه قرار دادیم. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Bsh1285I نیز ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت زمان نگهداری در انکوباتور (memmert_آلمان) نیز ۱۵ دقیقه بود. محصولات PCR پس از RFLP بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شده و با نیترا نقره رنگ آمیزی گردید. به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه های مختلف افراد بیمار و کنترل، از آزمون مربع کای بهره گرفته شد. نسبت افزایشنده (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ برای تخمین ارتباط میان پلی مورفیسم های مربوطه از ژن VSX1 و ریسک ابتلا به کراتوکونوس، مورد استفاده قرار گرفت. در کلیه محاسبات سطح احتمال (P<۰/۰۵) از نظر آماری معنی دار فرض گردید. بررسی آنالیزهای آماری از طریق نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته ها:

محصولات PCR پس از RFLP بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شده و با نیترا نقره رنگ آمیزی گردید. در صورت وجود پلی مورفیسم G جایگاه شناسایی ۶ نوکلئوتیدی ۵'-CGRYCG-۳' برای آنزیم Bsh1285I پدید آمده و توالی مورد نظر برش خورده و قطعات مورد نظر ایجاد می گردند. با توجه به این که در توالی ما به جز محل پلی مورفیسم یک جایگاه برش دیگر هم وجود داشت، در افراد هموزیگوت با ژنوتیپ GG، ۳ باند به طول ۴۱،۴۴،۱۰۶ جفت باز ایجاد می گردد. در افراد هتروزیگوت GT باند های ۴۱،۴۴،۱۰۶،۱۵۰ جفت بازی ایجاد می شود. لازم به ذکر است که قطعات ۴۱ و ۴۴ جفت بازی به علت اندازه کوچک معمولاً از ژل خارج می گردد. نتایج PCR-RFLP در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: محصولات PCR-RFLP پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪. M مارکر 100 bp، چاهک ۱: کنترل منفی (فاقد DNA)، چاهک ۲: uncut (فاقد آنزیم)، چاهک ۳: ژنوتیپ GT، چاهک ۴: ژنوتیپ GG. (قطعات ۴۱ و ۴۴ bp به علت اندازه کوچک از ژل خارج شده است).

جدول شماره ۱: توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم rs6050307 در ۲ گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ ها	بیمار	کنترل	OR (CI) %۹۵	P	CI	OR (CI) %۹۵	P
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
GG	۹۱	%۹۱	۸۸	%۸۸	۰/۸۷-۱/۰۶	۰/۹۶	۰/۴
GT	۹	%۹	۱۲	%۱۲	۰/۵-۳/۰۲	۱/۳۳	۰/۴
آلل G	۱۹۱	-	۱۸۸	-	-	۰/۷۹	۰/۷
آلل T	۹	-	۱۲	-	-	-	-

آمار، توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم rs6050307 در گروه مردان بیمار و مردان سالم تفاوت معنی داری نشان نداد؛ همچنین در مقایسه گروه زنان بیمار با گروه زنان سالم، نیز تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0.05$). از لحاظ توزیع ژنوتیپ های بین ۲ جنس اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول شماره ۲).

فراوانی آللی و ژنوتیپی مربوط به پلی مورفیسم rs6050307 در گروه کنترل و بیمار تعیین گردید که مطابق جدول شماره ۱ می باشد. برای مقایسه گروه جنسی از لحاظ ژنوتیپ پلی مورفیسم c.426C>A ژن VSX1 ۲ گروه زن و مرد بیمار جداگانه با گروه کنترل مقایسه شدند، در آنالیز

جدول شماره ۲: ارتباط فراوانی ژنوتیپی پلی مورفسم rs6050307 در ۲ گروه بیمار (کراتوکونوس) و کنترل (سالم)

به تفکیک جنسیت

ژنوتیپ ها	زنان بیمار		زنان سالم		مردان بیمار		مردان سالم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
GG	۴۳	۹۱/۶	۵۸	۹۰/۶	۴۸	۹۰/۵	۳۰	۸۳/۳
GT	۴	۸/۵	۶	۹/۳	۵	۹/۴۳	۶	۱۶/۶
P	۰/۵		۰/۳					

بحث:

در این مطالعه ما ارتباط پلی مورفسم rs6050307 ژن VSX1 را در ارتباط با بیماری کراتوکونوس بررسی کردیم. نتایج ما تفاوت معنی داری را بین فراوانی ژنوتیپی و آللی این پلی مورفسم با بیماری نشان نداد. در مورد ارتباط این پلی مورفسم با بیماری کراتوکونوس در چندین جمعیت، بررسی هایی انجام شده است. مطالعه ای در این زمینه توسط Wang و همکاران با هدف یافتن ارتباط پلی مورفسم های رایج تک نوکلئوتیدی مربوط به ژن های، VSX1, COL4A4, IL1A و IL1B با بیماری کراتوکونوس در جمعیت چینی انجام شد که در این مطالعه بین پلی مورفسم rs6050307 ژن VSX1 با بیماری کراتوکونوس ارتباط معنی داری مشاهده گردیده است که این یافته با نتایج مطالعه حاضر در تضاد می باشد (۲۴). مطالعه ای که اخیراً توسط Hao و همکاران در رابطه با بررسی ارتباط کراتوکونوس و گزارش جایگاه ژنتیکی در یک جمعیت چینی انجام شد، اختلاف معنی داری بین بیماری با پلی مورفسم rs6050307 مشاهده نگردید (۲۷)؛ همچنین در این مطالعه مقایسه حالات مختلف ژنوتیپی پلی مورفسم c.426C>A ژن VSX1 در مردان مبتلا به کراتوکونوس در مقایسه با زنان بیمار، تفاوت زیادی ندارد که این موضوع نشان دهنده ی نزدیک بودن توزیع ژنوتیپی در مردان با زنان مبتلا به کراتوکونوس می باشد.

نتایج مشاهده شده در رابطه با نقش پلی مورفسم مذکور در بیماری کراتوکونوس در تحقیق حاضر مشابه نتیجه مشاهده شده توسط Hao و همکاران در جمعیت چین

می باشد. البته در مطالعه ما ۹٪ بیماران و ۱۲٪ افراد سالم ژنوتیپ GT داشتند، در حالی که این میزان در جمعیت چینی صفر بود و به نظر می رسد در نژادهای مختلف فراوانی آلل ها متفاوت بوده و این می تواند یک علت در توجیه اختلافات به دست آمده در مطالعات باشد؛ همچنین در مطالعه حاضر یک نوکلئوتید سیتوزین با آدنین جایگزین می شود. تغییر در کدون ۱۳۱، CGC>AGC و در نتیجه تغییر مترادف p.Arg131Cys را داریم.

در مطالعات مختلف دیگری هم پلی مورفسم rs6050307 در بیماران مبتلا به کراتوکونوس گزارش گردید. مطالعه ای توسط Aldave و همکاران انجام شده است. در این مطالعه نیز به بررسی ژن VSX1 در ۱۰۰ بیمار مبتلا به کراتوکونوس پرداختند و پلی مورفسم rs6050307 (c.426C>A) را گزارش کردند (۲۵)؛ اما اشاره ای به فراوانی این پلی مورفسم و تأثیر ژنوتیپ های مختلف مربوط به این پلی مورفسم بر کراتوکونوس نشده است.

با توجه به مطالعات صورت گرفته می توان نتیجه گرفت، پلی مورفسم rs6050307 در بروز بیماری کراتوکونوس نقش ندارد؛ همچنین این اختلافات می تواند مربوط به نحوه ی وراثت و مکانیسم پیچیده بیماری کراتوکونوس و همچنین عوامل مختلفی از قبیل اثر متقابل بین ژن ها و پلی مورفسم های موجود در یک ژن در بروز بیماری باشد (۲۹،۲۸). به نظر می رسد مطالعات بیشتری جهت شناسایی ژن های کلیدی و

بررسی اثر متقابل این ژن ها و پلی مورفیسم های آن ها، صورت گیرد؛ همچنین بررسی هاپلوتایپ پلی مورفیسم های موجود در یک ژن و بررسی تأثیر عوامل محیطی در بروز بیماری، برای یادگیری بیشتر مکانیسم بیماری مهم است.

لازم است تا اقوام و جمعیت های مختلف ایرانی از نظر میزان پراکندگی پلی مورفیسم های این ژن و ارتباط شان با کراتوکونوس و حتی شدت این بیماری بررسی دقیق تری شوند تا اطلاعات مورد نیاز جهت پیشگیری و مدیریت کراتوکونوس وابسته به این ژن تأمین گردد.

نتیجه گیری:

این مطالعه به بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs6050307 ژن VSX1 و ارتباط آن با بیماری کراتوکونوس پرداخته است. با توجه به این که بیماری کراتوکونوس هتروژن بوده و ژن های زیادی در ایجاد این بیماری دخیل است، لازم است تحقیقات بیشتری در این رابطه صورت گیرد. با این حال مطالعات بیشتری

تشکر و قدردانی:

از کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، کمال تشکر و قدردانی را داریم. این پایان نامه در تاریخ ۱۳۹۳/۰۵/۰۴ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تصویب شده است. کد پایان نامه ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۳۲۰۲۰ می باشد.

منابع:

1. Hamilton JB. The Significance of Heredity in Ophthalmology. Preliminary Survey of Hereditary Eye Diseases in Tasmania. Br J Ophthalmol. 1938; 22(1): 19-43.
2. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. Am J Ophthalmol. 1986; 101(3): 267-73.
3. Zadnik K, Barr JT, Gordon MO, Edrington TB. Biomicroscopic signs and disease severity in keratoconus. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study Group. Cornea. 1996; 15(2): 139-46.
4. Rabinowitz YS. Intacs for keratoconus. Curr Opin Ophthalmol. 2007; 18(4): 279-83.
5. De Bonis P, Laborante A, Pizzicoli C, Stallone R, Barbano R, Longo C, et al. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. Mol Vis. 2011; 17: 2482-94.
6. Dobbins KR, Price FW, Jr., Whitson WE. Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the midwestern United States. Cornea. 2000; 19(6): 813-6.
7. Rabinowitz YS. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998; 42(4): 297-319.
8. Rahman W, Anwar S. An unusual case of keratoconus. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 2006; 43(6): 373-5.
9. Ihalainen A. Clinical and epidemiological features of keratoconus genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. Acta Ophthalmol Suppl. 1986; 178: 1-64.
10. Tanabe U, Fujiki K, Ogawa A, Ueda S, Kanai A. Prevalence of keratoconus patients in Japan. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1985; 89(3): 407-11.
11. Romero-Jimenez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: A review. Cont Lens Anterior Eye. 2010; 33(4): 157-66.
12. Tanwar M, Kumar M, Nayak B, Pathak D, Sharma N, Titiyal JS, et al. VSX1 gene analysis in keratoconus. Mol Vis. 2010; 16: 2395-401.
13. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. Am J Med Genet. 2000; 93(5): 403-9.
14. Parker J, Ko WW, Pavlopoulos G, Wolfe PJ, Rabinowitz YS, Feldman ST. Videokeratography of keratoconus in monozygotic twins. J Refract Surg. 1996; 12(1): 180-3.
15. Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N, Sandford-Smith JH. Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus? Eye. 2000; 14(4): 625-8.

16. Ambekar R, Toussaint KC, Jr., Wagoner Johnson A. The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011; 4(3): 223-36.
17. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin North Am*. 2003; 16(4): 607-20.
18. Falls HF, Allen AW. Dominantly inherited keratoconus. *J Genet Hum*. 1969; 17(3): 317-24.
19. Salabert D, Cochener B, Mage F, Colin J. Keratoconus and familial topographic corneal anomalies. *J Fr Ophtalmol*. 1994; 17(11): 646-56.
20. Hallermann W, Wilson EJ. Genetic aspects of keratoconus (author's transl). *Klin Monbl Augenheilkd*. 1977; 170(6): 906-8.
21. Javadi MA, Feizi S, Yazdani S, Sharifi A, Sajjadi H. Outcomes of augmented relaxing incisions for postpenetrating keratoplasty astigmatism in keratoconus. *Cornea*. 2009; 28(3): 280-4.
22. Tang YG, Rabinowitz YS, Taylor KD, Li X, Hu M, Picornell Y, et al. Genomewide linkage scan in a multigeneration Caucasian pedigree identifies a novel locus for keratoconus on chromosome 5q14.3-q21.1. *Genet Med*. 2005; 7(6): 397-405.
23. Levy D, Hutchings H, Rouland JF, Guell J, Burillon C, Arne JL, et al. Videokeratographic anomalies in familial keratoconus. *Ophthalmology*. 2004; 111(5): 867-74.
24. Wang Y, Jin T, Zhang X, Wei W, Cui Y, Geng T, et al. Common single nucleotide polymorphisms and keratoconus in the Han Chinese population. *Ophthalmic Genet*. 2013; 34(3): 160-6.
25. Aldave AJ, Yellore VS, Salem AK, Yoo GL, Rayner SA, Yang H, et al. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(7): 2820-2.
26. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2007; 27(9): 824-9.
27. Hao XD, Chen P, Chen ZL, Li SX, Wang Y. Evaluating the Association between Keratoconus and Reported Genetic Loci in a Han Chinese Population. *Ophthalmic Genet*. 2015; 36(2): 132-6.
28. Gonzalez V, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in parents of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(10): 1413-4.
29. Hughes AE, Dash DP, Jackson AJ, Frazer DG, Silvestri G. Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(12): 5063-6.

Study of rs6050307 polymorphism of VSX1 gene in patient with keratoconus in Chaharmahal and Bakhtiari

Karami-Eshkaftaki R¹, Farrokhi E², Zia N¹, Hashemzadeh-Chaleshtori M^{2*}

¹Biology Dept., Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 27/Dec/2015 Accepted: 29/Feb/2016

Background and aims: Keratoconus (KC) is a degenerative eye disorder, which is leading to irregular corneal surface, thinning of cornea, changing the shape of a cone and decreased vision. The disease incidence between 1/500 to 1/2,000 people worldwide is estimated. Several genes associated with the disease have been studied, but evidence suggests a major role of visual system homeobox1 (VSX1) in the etiology of KC. The aim this study was to investigate the relationship between rs6050307 single nucleotide polymorphisms (SNP) in exon 1 of the VSX1 gene with keratoconus disease in Chaharmahal and Bakhtiari province.

Methods: In this laboratory descriptive study, rs6050307 polymorphisms of VSX1 gene in 100 KC patients and 100 healthy individuals have been studied. DNA was extracted using standard phenol chloroform method and rs6050307 were determined by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Allele frequency of this polymorphism were analyzed using chi-square test and the relevance between allele frequency polymorphism were evaluated with the disease.

Results: Genotype distribution of different alleles of rs6050307 VSX1 gene between patient and control samples was not significant ($P>0.05$).

Conclusion: Regarding to the findings in this research, it seems that rs6050307 of VSX1 gene not involved as a risk factor in the pathogenesis of keratoconus.

Keywords: Keratoconus, VSX1 gene, PCR restriction fragment length polymorphism.

Cite this article as: Karami-Eshkaftaki R, Farrokhi E, Zia N, Hashemzadeh Chaleshtori M. Study of rs6050307 polymorphism of VSX1 gene in patient with keratoconus in Chaharmahal and Bakhtiari. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 1-8.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983833331471, E-mail: mchalesh@yahoo.com